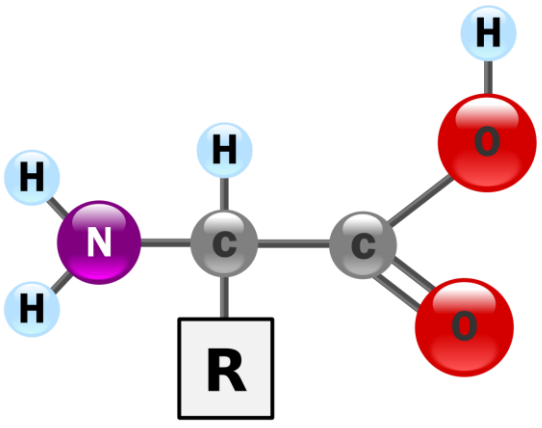
البروتينات Proteins

البروتينات : هي مركبات عضوية تنتشر في جميع الخلايا والانسجة الحية , فهي تؤلف نصف وزن الجسم الجاف ، تحتل هذه الجزيئات المرتبة الاولى في الجسم لان لها خصائص لا يشابها اي نوع اخر من المركبات الحيوية ، لذا فهي تستحق اسمها المأخوذ من الكلمة اللاتينية proteios والتي تعني المرتبة الاولى .

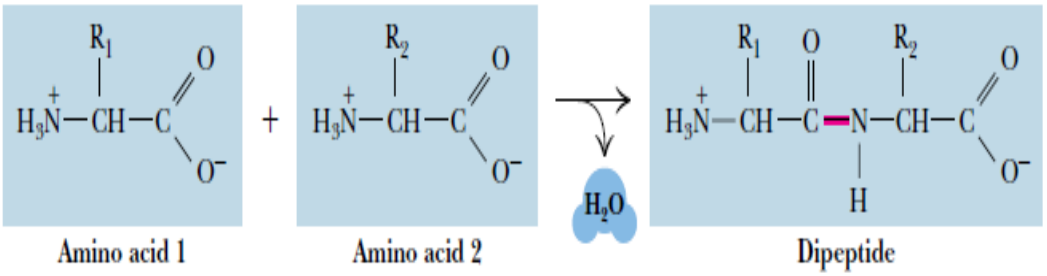
الصنف	الامثلة
الانزيمات	التريبسين , البيبسين
الهرمونات	الانسولين
البروتينات الخازنة	زلال البيض , الكازئين
البروتينات الناقلة	الهيموغلوبين
البروتينات المتقلصة	الميوسين
البروتينات الوقائية	الكلوبيولين
السموم	سم الثعبان
البروتينات التركيبية	الكولاجين

الاحماض الامينية Amino acids

تتألف الجزيئات البروتينية من وحدات بنائية اساسية يطلق عليها الاحماض الامينية , وتكون الجزيئة البروتينية حاوية على عدد كبير من هذه الحوامض مرتبطة مع بعضها باواصر ببتيدية مكونة مركبات بوليمرية , ولهذا تكون البروتينات ذات اوزان جزيئية عالية



البروتينات : هي عبارة عن جزيئات بوليمرية كبيرة مكونة من عدد من الوحدات البنائية الصغيرة تسمى الاحماض الامينية , اذ ترتبط هذه الوحدات مع بعضها بواسطة اواصر ببيتيدية (Peptide bond) , وهي من الناحية العضوية اواصر امايدية تنشأ من التفاعل بين مجموعة الكاربوكسيل للحامض الاميني الاول مع مجموعة الامين للحامض الاميني الثاني بعد فقدان جزيئة ماء .



ان اتحاد حامضيين امينيين باصرة ببيتيدية واحدة تعطي مركب ببيتيدي ثنائي Dipeptide

اما اذا ارتبط ثلاث احماض امينية فالمركب الناتج ببيتيد ثلاثي Tripeptide ,

واذا اربعة ببيتيد رباعي Tetrapeptide وهكذا ,

اما اذا ارتبط ١٠ احماض امينية فيسمى المركب ببيتيد متعدد Polypeptide ,

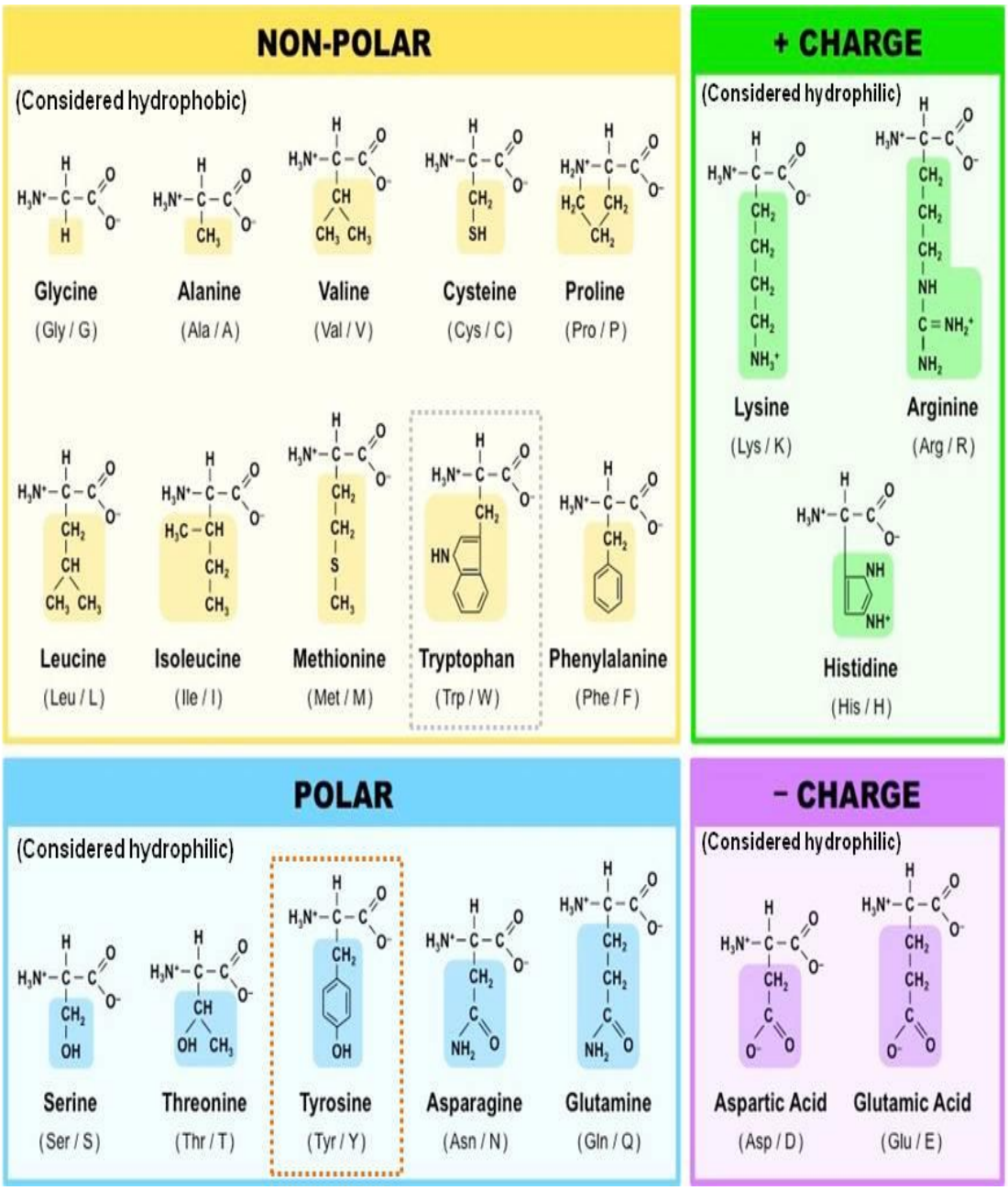
اما اذا اصبح عدد الحوامض الامينية اكثر من ٤٠ حامض اميني عند ذلك يسمى المركب الناتج بروتين

كذلك اذا تكونت الجزيئة من ارتباط عدد من السلاسل البيبتدية المتعددة مع بعض تسمى الجزيئة الناتجة بالبروتين .

تختلف الأحماض الأمينيّة باختلاف المجوعة الطرفية (R) ولذا يمكن تقسيم الاحماض الامينة تبعا لقطبية تلك السلاسل في المحاليل الى :

1- الأحماض الأمينيّة غير القطبية Nonpolar amino acids (غي محبة للماء Hydrophobic)
2- الأحماض الأمينية القطبية غير المشحونة (المتعادلة) Polar (uncharged) amino acids
3- الأحماض الأمينية القطبية الحامضية (شحنة سالبة) Polar (Acidic) amino acids
4- الأحماض الأمينية القطبية القاعدية (شحنة موجبة) Polar (Basic) amino acids

تتميز الاحماض الامينية القطبية بكونها اكثر ذوبانا في الماء من الاحماض الامينية غير القطبية ويعود ذلك الى ان المجاميع الطرفية R عبارة عن مجاميع قادرة على تكوين روابط هيدروجينية مع الماء.
أغلبية الأحماض الأمينية في المجموعات الثانية والثالثة والرابعة [محبة للماء .(hydrophilic)]
ونتيجة لذلك، تتواجد متجمعة على سطح البروتينات الكروية في المحاليل المخففة بماء



الاختبارات اللونية للمواد البروتينية

تعتمد الكشوفات اللونية للمواد البروتينية على وجود الاواصر الببتيدية أو وجود مجاميع كيمياوية مميزة في تركيب الاحماض الامينية المكونة للسلسلة البروتينية .

1- اختبار بيوريت Biuret Test

يعتبر كشف عام عن جميع المواد البروتينية، وليس الاحماض الامينية اذ يشترط في هذا الكشف توفر على الأقل اصرتين ببتيديتين (ببتيد ثلاثي).

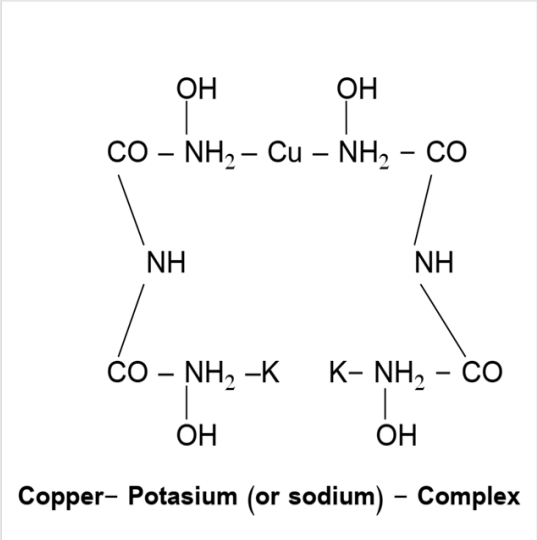
لذا يكون موجب مع جميع المركبات البروتينية التي تحتوي على آصرتين من الاواصر الببتيدية على الاقل كما يعطي نتيجة موجبة مع نواتج التحلل المائي للبروتينات حتى مرحلة الببتيدات الثلاثية Tripeptides.

أما الببتيدات الثنائية والأحماض الامينية الحرة فلا تعطي هذا الاختبار لكون الاحماض الامينية لا تحتوي على آصرة ببتيدية والببتيدات الثنائية تحتوي على آصرة ببتيدية واحدة.

النتيجة الموجبة لاختبار بيوريت هي تكون مركب معقد يسمى مركب البيوريت
Copper - Potasium (or sodium) - Complex الذي يكون بنفسجي اللون.

مكونات الاختبار:

كبريتات النحاس ($CuSO_4$) لتوفير ذرة نحاس مركزية للمعقد.
هيدروكسيد الصوديوم لتوفير وسط قاعدي
ملح روشل $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$

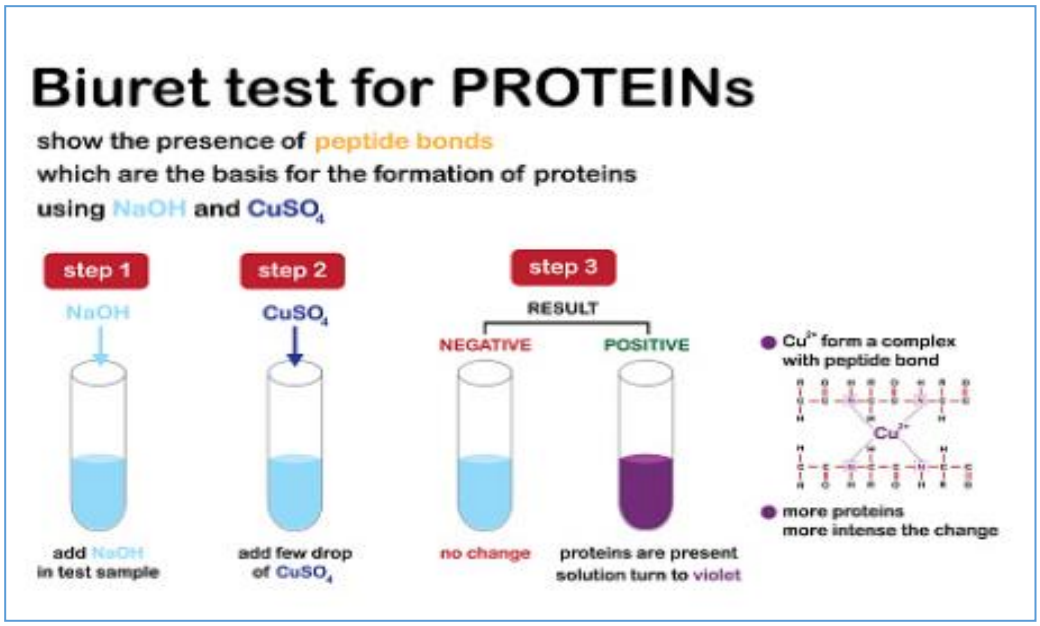


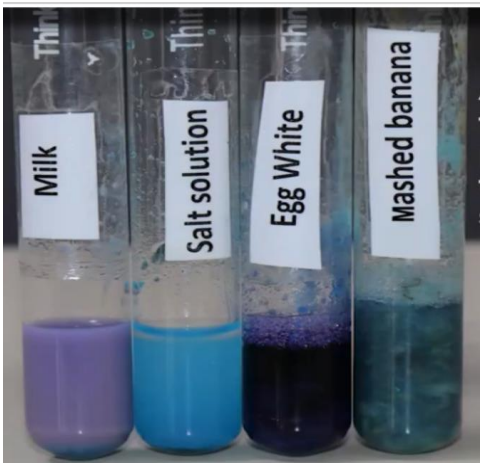
Copper– Potasium (or sodium) – Complex

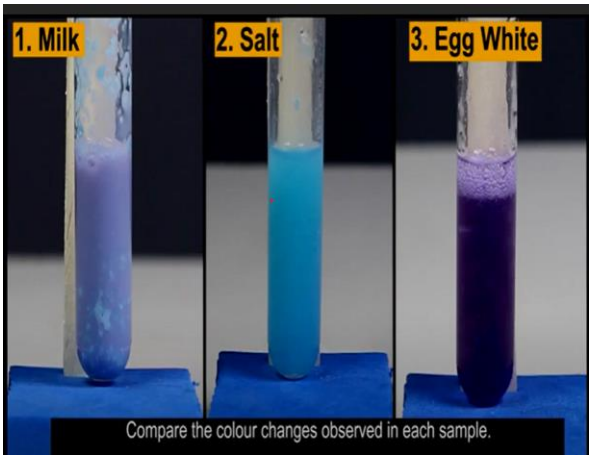
طريقة العمل:

1. يضاف (٢-٣) قطرات محلول كبريتات النحاس المائية الى ١ مل محلول البروتين
2. يضاف (١مل) من محلول (NaOH 10%) ويمزج جيدا ويلاحظ اللون البنفسجي يدل على المعقد البروتيني المتكون.

ملاحظة: يعتمد شدة اللون على عدد الاواصر الببتيدية





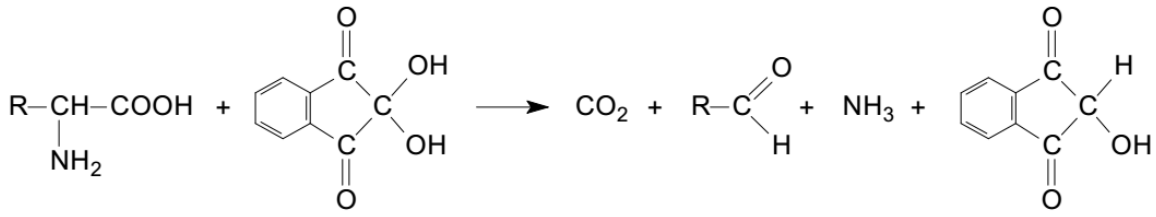


سؤال : لماذا الالوان مختلفة في نتيجة الاختبار؟؟؟

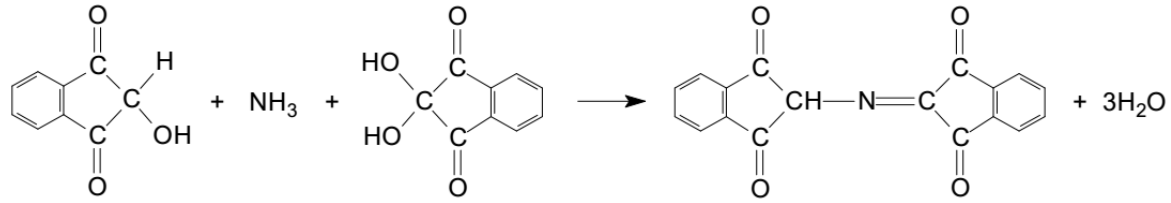
2- اختبار النهيدرين Ninhydrine

يعد هذا التفاعل من التفاعلات المهمة المستخدمة في الكشف عن وجود الاحماض الامينية.

يعتبر هذا الاختبار عام لجميع البروتينات والأحماض الامينية لأنه شرط التفاعل وجود مجموعة امين حرة (NH_2 -) حيث يتفاعل مركب النهيدرين مع الأحماض الامينية بالتسخين فيتصاعد غاز CO_2 ويتلون المحلول بلون ازرق أو بنفسجي ماعدا حامض البرولين يعطي لون اصفر.

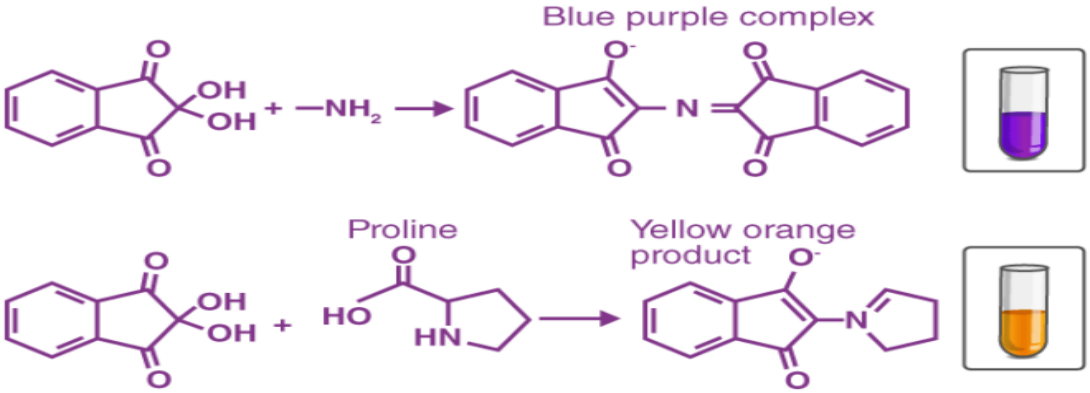


Ninydrin Reduced ninydrin



Reduced ninhydrin Ninhydrin Violet-blue condensation product

فعند تسخين الحامض الاميني مع محلول النهيدرين، يفقد الحامض الاميني مجموعته الامينية، كما هو موضح في التفاعل السابق، مع ظهور لون أزرق يمكن اعتماده كدليل على وجود الاحماض الامينية، او البيتيدات البسيطة والمتعددة.



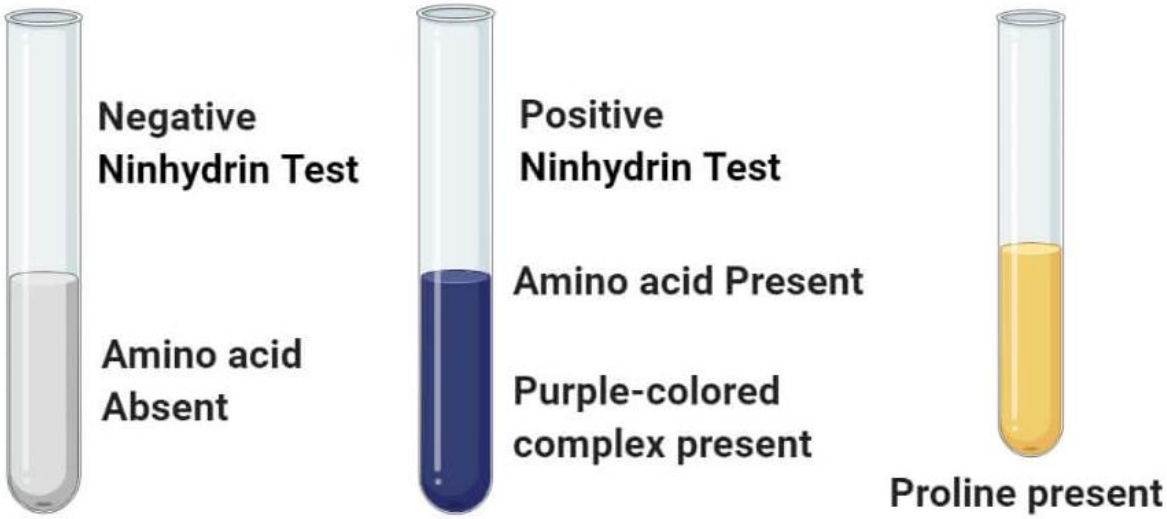
مكونات الاختبار:

محلول ننهيدرين ٠,١%

محلول ألبومين البيض (بروتين) – محلول الحمض الأميني جلايسين ٠,٥% (ويمكن استعمال أنواع أخرى من الأحماض الأمينية) - محلول الحامض الأميني برولين ٠,٥% .

طريقة العمل:

1. نأخذ ٣ أنابيب اختبار زجاجية وأضيفي لها ١مل من المحاليل التالية – كلٍ على حدة – محلول ألبومين البيض (بروتين) ، محلول جلايسين (أو أي حامض أميني) – محلول برولين .
2. نضيف لكل أنبوب ١ مل من محلول ننهيدرين ٠,١%
3. نسخن في حمام مائي لمدة دقيقتين لظهور اللون



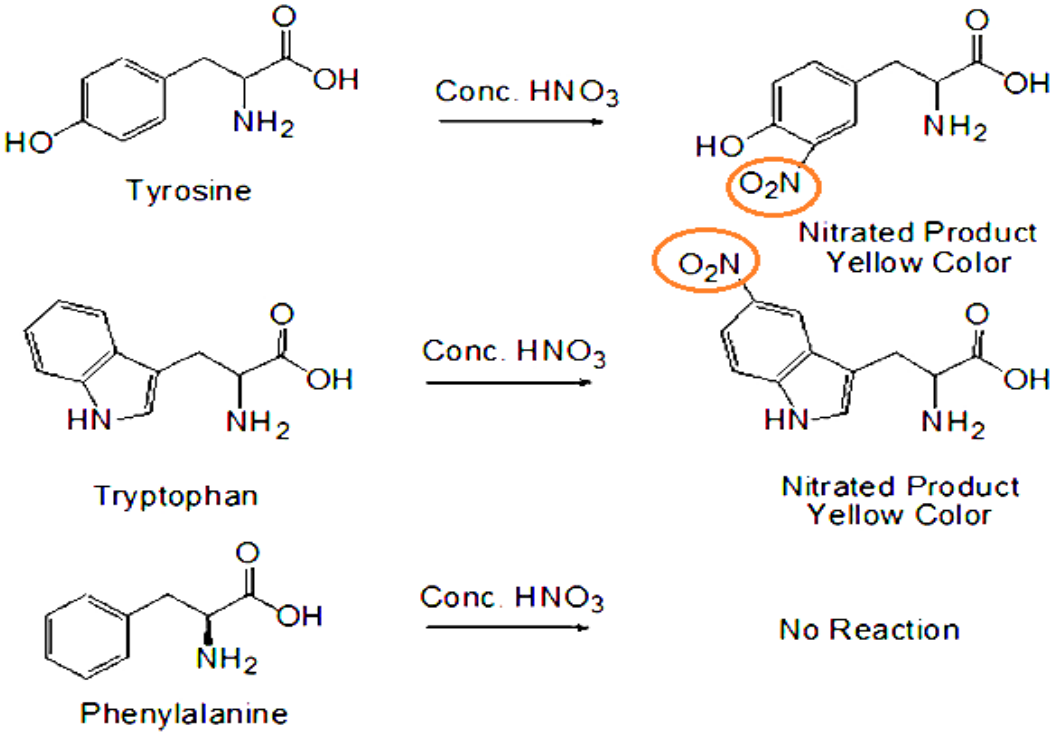
سؤال : لماذا الالوان مختلفة في نتيجة الأختبار؟؟؟

الحامض الاميني البرولين والهيدروكسي برولين لا يعطي كشف موجب مع النهيدرين؟ بسبب ان مجموعة الامين تكون مرتبطة غير حرة

3- اختبار الزانثوبروتين Xanthoprotein Test

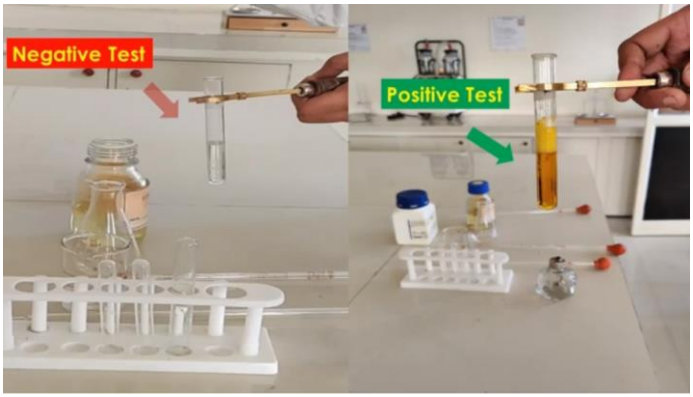
يعتمد هذا الاختبار على وجود حلقة البنزين في تركيب الحامض الاميني فهو كشف خاص بالأحماض الامينية الأروماتية مثل التايروسين, التربتوفان , حيث يعتمد هذا الاختبار على نيترة Nitration حلقة البنزين (إدخال مجموعة النترو NO_2 في حلقة البنزين) الموجودة في هذه الأحماض الامينية , كما يعطي الاختبار نتيجة موجبة مع جميع المركبات الأروماتية.

النتيجة الموجبة هي تكون اللون الأصفر عند غلي البروتين مع حامض النتريك الذي يتحول إلى اللون البرتقالي عند إضافة هيدروكسيد الصوديوم .



المواد:

محاليل الاختبار (حوامض امينية (١%) كالايسين , تايروسين , تربتوفان , فينيل النين) حامض النتريك المركز- HNO_3 هيدروكسيد الصوديوم ٤٠ %او هيدروكسيد الامونيوم



طريقة العمل:

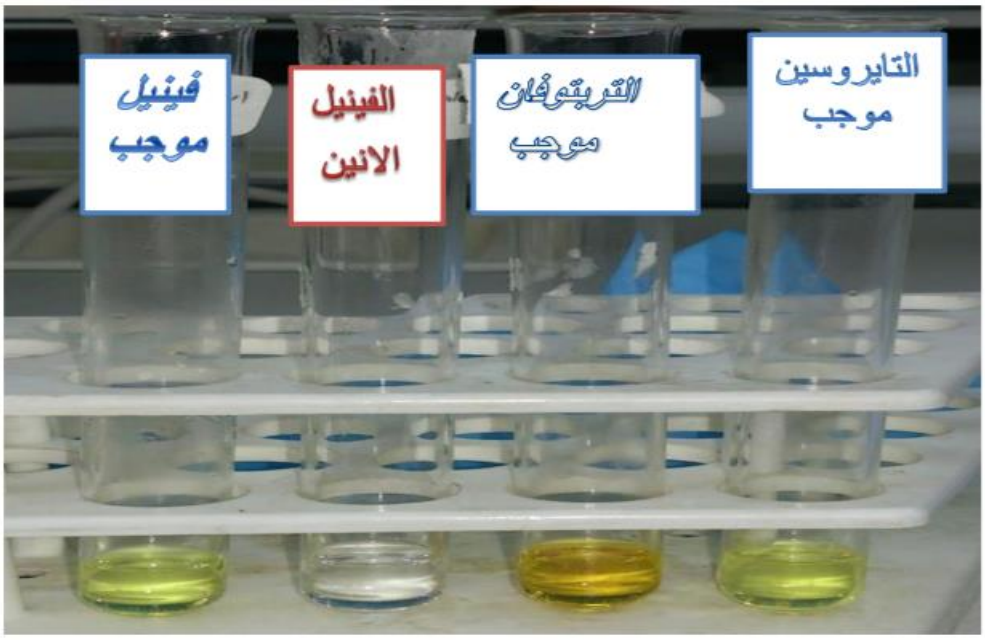
أضف إلى حوالي ٠,٥ مل من محلول الاختبار في انبوبة اختبار

يضاف حجماً مساوياً من حامض النتريك المركز

توضع الانابيب في حمام مغلي لعدة دقائق

ثم يبرد ويلاحظ ظهور لون أصفر

عند جعل المحلول شديد القلوية بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم او هيدروكسيد الامونيوم ويلاحظ تحول اللون الاصفر إلى البرتقالي.



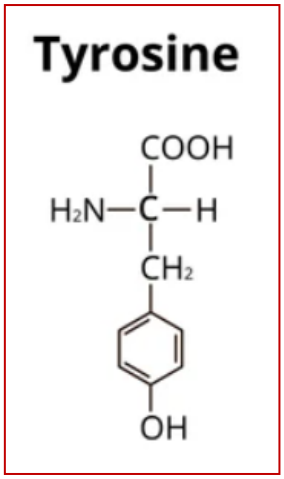
سؤال : لماذا الالوان مختلفة في نتيجة الأختبار؟؟؟

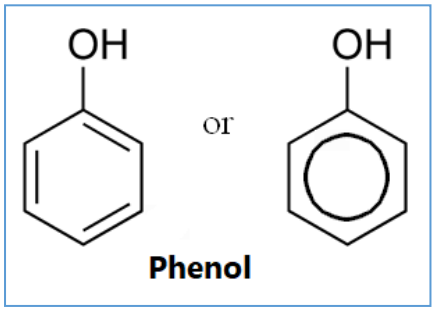
- ما يفسر تلون الجلد باللون الاصفر عند ملامسته لحامض النتريك؟ لانه يتفاعل مع الاحماض الامينية الأروماتية الداخلة في تكوين الجلد
- قد يظهر راسب ابيض عند إضافة حامض النتريك إلى محلول البروتين نتيجة لترسيب الميتابروتين في حالة الألبومين.
- كما يلاحظ بأن الجيلاتين لا يعطي نتيجة موجبة مع الكشف لعدم احتوائه على الاحماض الامينية الأروماتية.
- من الصعب نترات فينيل ألانين في الظروف العادية لذلك لا يستجيب لهذا الاختبار لان حلقة البنزين غير نشطة وعالية الثباتية.

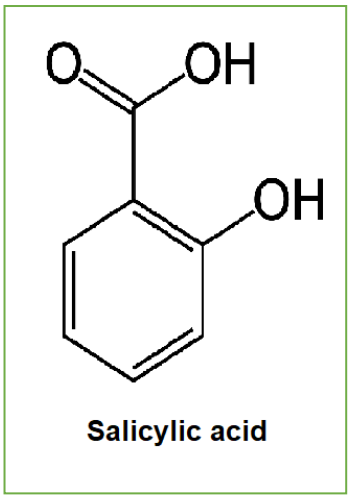
4- اختبار ميلون Millons Test

اختبار خاص للكشف عن الحامض الاميني التايروسين. يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود الحامض الاميني التايروسين لكونه الحامض الاميني الوحيد الذي يحتوي على مجموعة الفينول.

كما يعطي الاختبار نتيجة موجبة مع البروتينات الحاوية على هذا الحامض الاميني كما يعتبر هذا الاختبار كشف عام عن جميع الفينولات مثل حامض السالسليك.

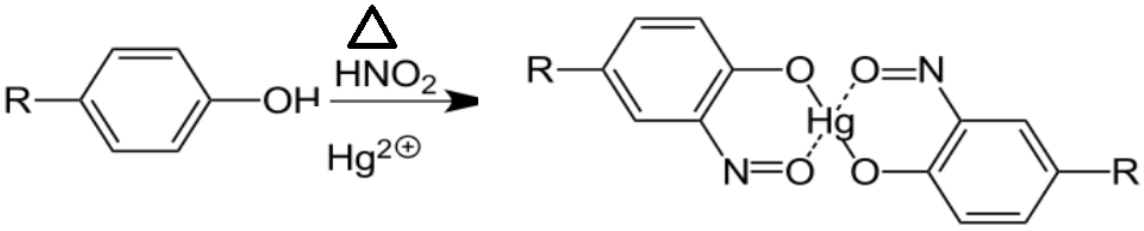






تتفاعل مجموعة الهيدروكسي فينيل في الحامض الاميني التيروسين مع كاشف ميلون (وهو عبارة عن أيونات الزئبق مذابة في أحماض النترات) فيتكون راسب بني محمر من أملاح الزئبق .

هذا الكشف إيجابي أيضاً مع مركبات الفينول؟؟؟



المواد :

1. حوامض امينية (١%) كاليسين , تايروسين , تربتوفان او محاليل مختلفة
2. كاشف ميلون يتكون من ١٥%كبريتات الزئبقيك +١٥ %حامض الكبريتيك المركز
3. نترات الصوديوم

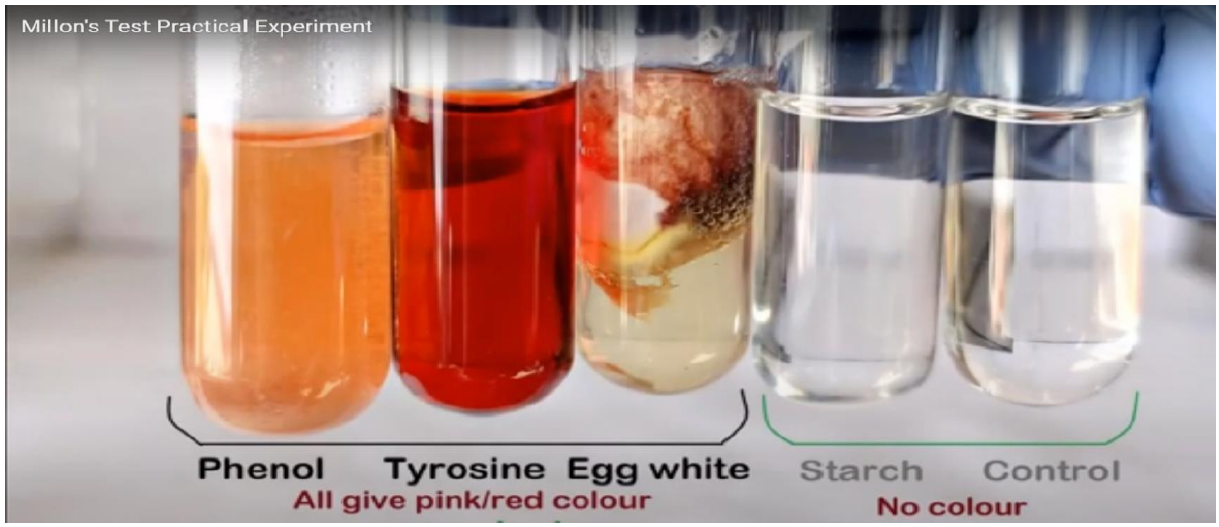
طريقة العمل

1. ناخذ ١ مل من المحلول المجهول
2. نضيف ١ مل من كاشف ميلون
3. ضعة في حمام مغلي لمدة ٢-١٠ دقائق ثم يترك ليبرد
4. نضيف ٥ قطرات من محلوا نتريت الصوديوم ونلاحظ تغيير اللون ليعطي راسب احمر من ملح الزئبق لثنائي نترو التايروسين.

لا يجري هذا الاختبار في وسط قاعدي

المشاهدة:

- النتيجة الموجبة لاختبار هو تكون اللون الاحمر أو الراسب الاحمر .
- لا يعطي الجيلاتين نتيجة موجبة مع الاختبار لعدم احتوائه على الحامض الاميني التايروسين .
- عدم إضافة كمية زائدة من محلول ميلون لانه يؤدي إلى اختفاء اللون الاحمر بالغليان



سؤال : لماذا الالوان مختلفة في نتيجة الأختبار؟؟؟

المركبات مثل حامض السالسليك والمركبات الفينولية تعطي نتيجة إيجابية لهذا الاختبار. وبالتالي ، يجب تجنب أي مركبات فينولية أخرى قد تكون موجودة في أنبوب الاختبار.

يمكن ملاحظة تكوين راسب أبيض أو أصفر على الفور بعد إضافة الكاشف بسبب دنترة البروتينات بواسطة الأيونات الزئبقية.

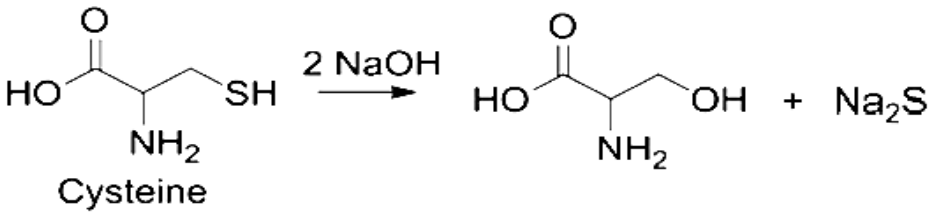
5- اختبار الكبريت Sulfur Test

يستخدم هذا الاختبار للتعرف على وجود الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت مثل الحامض الأميني السستين و البروتينات الحاوية عليه. (ولا يصح مع الميثيونين)

طريقة التفاعل

إن الكبريت الموجود في الأحماض الأمينية (البروتين) يتفاعل مع القاعدة (NaOH) مكونا كبريتيد الصوديوم .

تفاعل كبريتيد الصوديوم مع خلات الرصاص مكونا كبريتيد الرصاص الأسود اللون



Cysteine

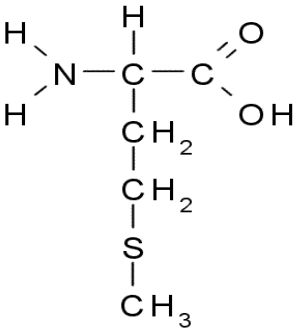
$$Na_2S + Pb(CH_3COO)_2 \longrightarrow PbS\downarrow + 2\,Na(CH_3COO)$$

راسب أسود أو رمادي

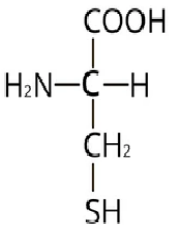
إذن النتيجة الموجبة لكشف الكبريت هو ظهور راسب اسود أو رمادي الذي يدل على وجود الكبريت.

ملاحظة :- الميثايونين يحتوي على الكبريت إلا انه لا يعطي نتيجة موجبة مع اختبار الكبريت كما في الكازين لكون الكبريت غير طرفي في هذا الحامض الأميني .

في الميثايونين تكون الاصرة بين (C-S) قوية جدا تحتاج الى طاقة عالية اما في السستين تكون الاصرة (H-S) قوية لكن يمكن كسرها بوجود القاعدة . أي ان مجموعة ال S تكون مقيدة وليست طرفية كما في السستين.



Methaionine

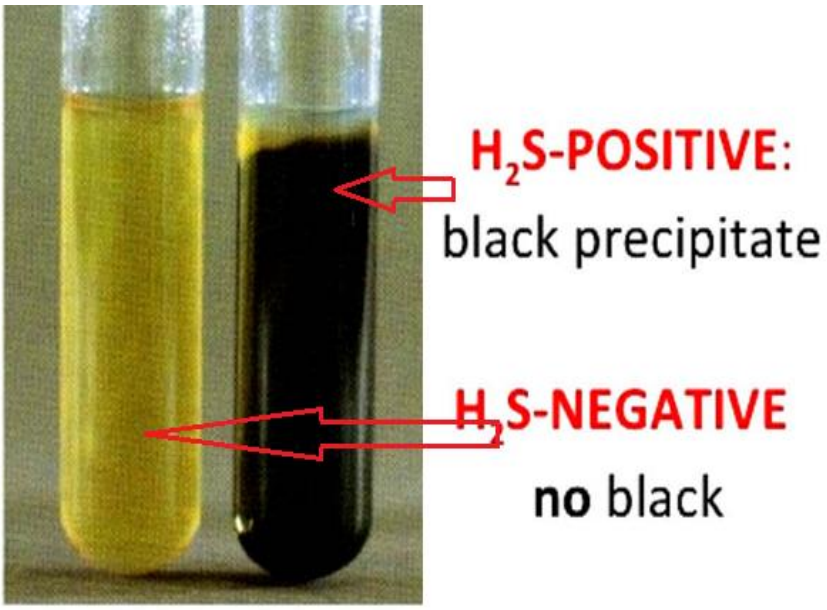


Cysteine

طريقة العمل

يسخن ١ مل من محلول بروتيني مع ١ مل من (٤٠%)هيدروكسيد الصوديوم لمدة ٢ دقيقة . يبرد المحلول ويضاف له ٠,٥ مل محلول خلات الرصاص ثم يسخن

نلاحظ ظهور راسب ابيض او رمادي او بني دلالة على وجود الكبريت

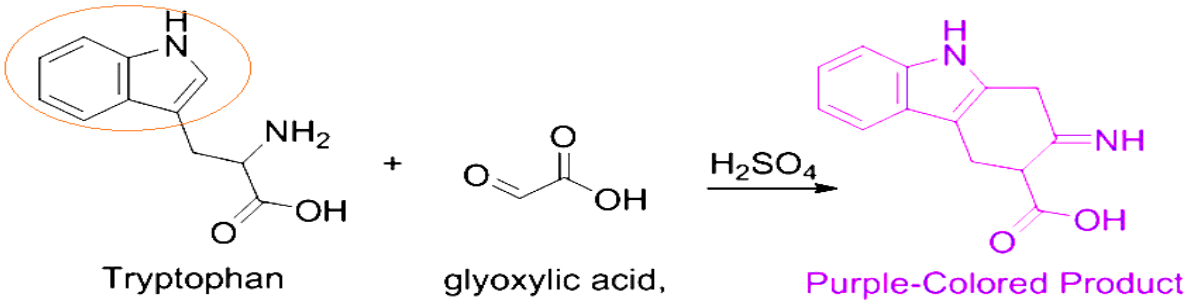


يتم الحصول على عكارة سوداء طفيفة مع الكازين ؟؟ بسبب انخفاض محتواه من الكبريت ويعطي الجيلاتين نتيجة سلبية ؟؟؟

6- اختبار هوبكنز كول Hopkins -Cole Test (Vanillin)

يستخدم هذا الاختبار للتعرف على وجود الحامض الأميني التربتوفان لكونه الحامض الأميني الذي يحتوي على حلقة انيدول في تركيبة . يعطي التريتوفان وجميع البروتينات الحاوية عليه هذا الاختبار، وتتشكل نواتج بلون بنفسجي

أساس الاختبار: تتفاعل حلقة الانيدول في التربتوفان في وسط حامضي مثل (حامض الكلايوكسيليك Glyoxylic acid) معطية نواتج تكاثف بلون بنفسجي وفق التفاعل التالي:



Tryptophan glyoxylic acid, Purple-Colored Product

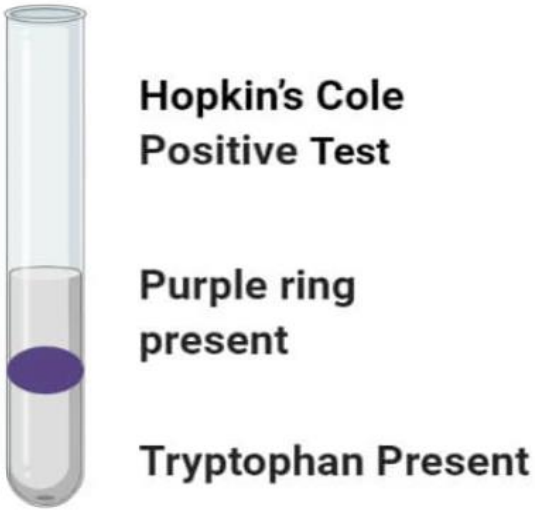
طريقة العمل:

1- تضاف٥ قطرات من الكاشف (حامض الأوكزاليك و مسحوق المغنيسيوم و حامض الخليك الثلجي)

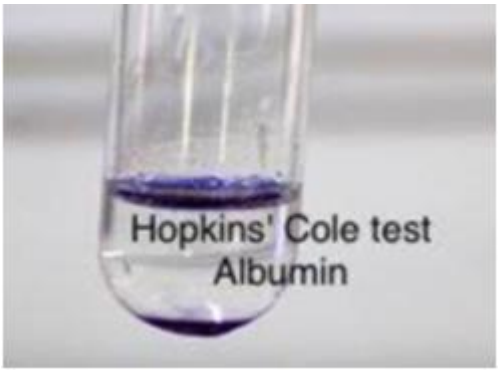
2- تضاف اليه ١٠قطرات من محلول بروتين ويرج جيداً.

3- يضاف ١-٢ مل من حامض الكبريتيك المركز بحذر ويلاحظ تكوين الحلقة الملونة

النتيجة الموجبة هي تكون حلقة بنفسجية بين طبقتي البروتين والحامض التربتوفان و البومين

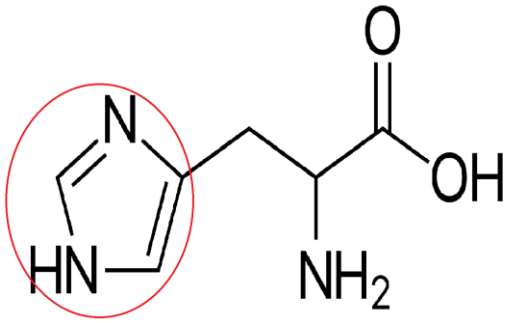


اختبار كول هوبكن السلبي: الكلايسين و (الجيلاتين لعدم احتوائه على التربتوفان)

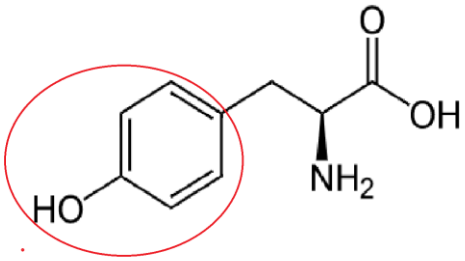


7- اختبار باولى Pauly's Test

يستخدم هذا الاختبار للتعرف على وجو د الحامض الأميني التايروسين أو الحامض الأميني الهستدين حيث إن الأول يحتوي على مجموعة الفينول والثاني يحتوي على مجموعة الاميدازول والنتيجة الموجبة للكشف هو ظهور اللون الأحمر المكتوم أو الغامق الذي يدل على وجود هذه الأحماض الامينية.



Histidine



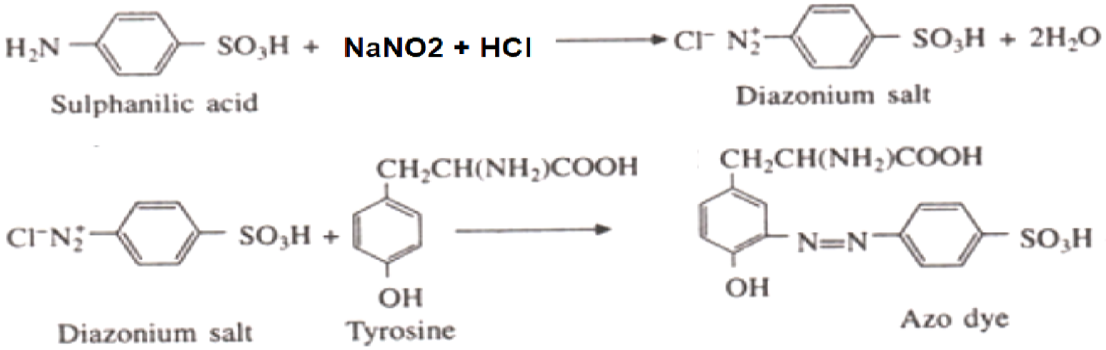
Tyrosine

مبدأ الاختبار:

يتفاعل حامض السلفانيليك مع حلقة إلايميدازول في الهستدين (او الفينول في التايروسين) في وسط قلوي لتشكيل مركب أحمر او اصفر اللون، لكن هذا الاختبار اكثر حساسية للهستدين.

Sulphanilic acid + HCl → Diazonium salt + $2H_2O$

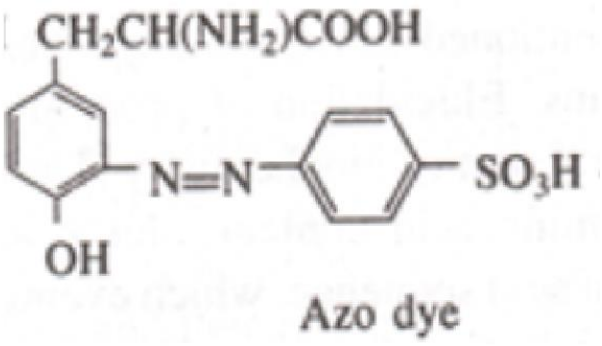
Diazonium salt + [Tyrosine or Histidine] → Azo dye (red color)



كاشف باولي: (حامض السلفانيليك Sulphanilic acid) و حامض الهيدروكلوريك HCl ونتريت الصوديوم($NaNO_2$)

طريقة العمل:

1. يمزج ١ مل من حامض السلفانيليك مع ١ مل من (محلول حامض اميني او بروتين) في أنبوب اختبار ويبرد المحلول في حمام ثلجي.
2. يضاف ١ مل محلول نترت الصوديوم ويترك المحلول لمدة ٣ دقائق في حمام ثلجي
3. يجعل المحلول قاعدي بإضافة ٢ مل من كاربونات الصوديوم $NaCO_3$ ونلاحظ تغير اللون الى ....



Azo dye

في هذا الاختبار يجب ملاحظة

وسط التفاعل بارد جدا ؟ بسبب ان املاح الدايزونيوم تكون غير مستقرة لكي تتكون تحتاج وسط بدرجة حرارة واطئة .

يجري التفاعل في وسط قاعدي.

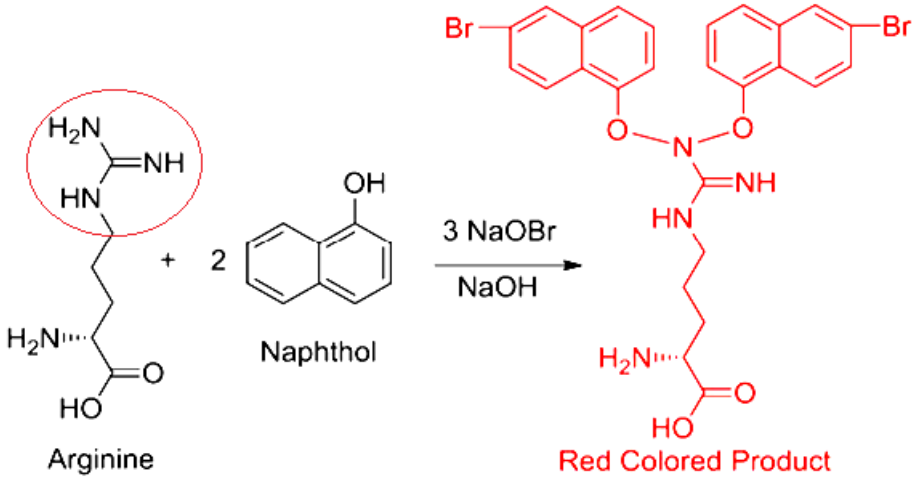
لا يسمح الاختبار بالتمييز بين الهيستيدين والتيروسين. يمكن إجراء اختبار ميلون لأن الهيستدين يعطي نتيجة سلبية في اختبار ميلون

8- .اختبار ساكاجوشى Sakaguchi Test

اختبار خاص يكشف عن مجموعة الكوانيدين و التي تشكل جزءا من الحامض الاميني الآرجينين.

تتفاعل مجموعة الكوانيدين الموجودة في الآرجنين مع مركب ألفا - نافثول ذو لون أحمر في وجود مركب ماء البروم (او ماء الكلور) كعامل مؤكسد فيعطي معقدا غامق يدل على وجود هذه المجموعة وبالتالي وجود حامض الآرجينين

.



طريقة العمل:

1. في انبوبة اختبار نضيف ١ مل من محلول البروتين
2. يضاف اليه ٤ قطرات من هيدروكسيد الصوديوم (١٠%)
3. تضاف ٢ قطرة من الفانفثول α-Naphthol الكحولي
4. يرج جيدا ثم يضاف الية (٥-١٠) قطرات من ماء الكلور او البروم (البروم يكون حارق يستخدم بحذر) مع الرج ويلاحظ تكون اللون الأحمر.

ترسيب البروتينات Protein Precipitation

الترسيب: هي عملية التخلص من المذيب والحصول على المادة المذابة بشكل راسب.

وتعتبر هذه الطريقة كنوع من أنواع تنقية البروتينات وفصل الشوائب عن المحاليل البروتينية.

ترسيب البروتينات

يحصل الترسيب للجزيئات البروتينية بإزالة الغشاء المائي الموجود حولها تفقد الطبقة الواقية لها والتي كانت تحيط بها (وتسبب ذوبانها) فتتجمع هذه الجزيئات على بعضها البعض فيكبر حجمها ويثقل وزنها وبالتالي تترسب إلى أسفل المحلول، ويلاحظ خلال هذه العملية بأن المحلول الحاوي على الجزيئات البروتينية في البدء يتعكر ثم يصفو نتيجة لترسب الجزيئات البروتينية منه تحت تأثير المادة المرسبة

تجلط او تخثر البروتينات لا يؤثر على الشكل الأولي للبروتين الذي يتضمن ترتيب الأحماض الأمينية في سلاسل وارتباطها ببعضها البعض بروابط بيبتيدية وهي روابط تساهمية قوية لا تتأثر بعوامل التخثر.

بعض البروتينات الممسوخة عند إزالة العامل الذي أدى إلى تخثرها ومسخها فإنها ترجع إلى تركيبها الطبيعي عند وضعها في محلول درجة حرارته و أسه الهيدروجيني (pH) مثاليتان (أي عند هاتين القيمتين يكون البروتين في حالته الطبيعية و أنشط حالاته الوظيفية) وذلك لأن الروابط الضعيفة التي تكسرت وغيرت شكل البروتين ترجع و تتكون مرة أخرى تلقائيا.

لترسيب البروتين يجب تقليل ذائبيته بالماء ويتم ذلك اما

بسحب جزئية ماء / تغير قيمة pH / كسر الاصرة الهيدروجينية وتكوين أواصر أخرى جديدة.

الترسيب نوعان:

ترسيب عكسي: يمكن من خلاله اعاده المادة المترسبة الى حالتها الذائبة بعد إزالة تأثير العامل المرسب.

ترسيب غير عكسي: لا يمكن من خلاله اعاده المادة المترسبة الى حالتها الأولى الذائبة حتى بعد إزالة تأثير العامل او المادة المرسبة وبالتالي يفقد البروتين خواصه الحيوية ويصبح بروتين غير فعال.

العوامل التي تعتمد عليها عملية الترسيب:

1- **عامل الشحنة**:

البروتينات جزيئات تمتلك شحنات موجبة وسالبة وعندما تتعادل تلك الشحنات الكهربائية للبروتين (أي تتساوى الشحنات الموجبة والسالبة) سوف يكون البروتين بهذا الحالة بشكل (Zwitter Ion) فيترسب البروتين عندما يسلط عليه مجال كهربائي لأنه اصبح بشكل ايون متعادل الشحنة الكهربائية (zwitter ion).هنا يترسب البروتين عند نقطة التعادل الكهربائية (Isoelectric point) (P.I) .

(pHi) : هي قيمة pH التي يترسب عندها البروتين. أي تتعادل فيه شحناته الموجبة مع السالبة فلا يهاجر باتجاه قطب موجب او سالب عند تسليط مجال كهربائي عليه.

2- **عامل الترابط بين البروتين و المذيب:**

يعتبر الماء المقطر من اكثر المذيبات استخداما في اذابة البروتينات حيث تنشا اصرة (Protein- H_2O) . عندما يراد ترسيب البروتين يجب التخلص من جزئيات الماء وسحب جزيئات الماء بالتالي تكسر اصرة (Protein- H_2O) وتتولد اصرة جديدة هي (Protein - Protein) فيترسب البروتين لكبر وزنه الجزئي المتكون.

1. الترسيب بواسطة المعادن الثقيلة

تترسب البروتينات بواسطة العناصر الثقيلة حيث تعتمد فكره الترسيب على اضافه محلول فلز ثقيل (Pb^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Ag^{+}) الى محلول البروتين الحامل لشحنه سالبه (نتيجة معاملته بقاعدة) وترسيبه على شكل بروتينات الفلز حيث يعادل الايون الموجب الشحنة السالبة على جزئيه البروتين فيرسبها .

عند حوالي PH 7 يكون البروتين مشحوناً بشحنة سالبة وإضافة الفلز الثقيل يعمل على معادلة الشحنة وترسيب البروتين ويلاحظ أن زيادة ال PH عن 7 قد يرسب الفلز على هيئة هيدروكسيد كما أن المزيد من الفلزات الموجبة قد تعطي البروتين شحنة موجبة وتعيد ذوبانه. **ويعتبر ترسيب عكسي من الممكن إعادة البروتين الى حالته الذائبة من جديد بزيادة المادة المرسبة**

وقد استخدمت هذه الطريقة في معالجة حالات التسمم بالمعادن الثقيلة حيث انه عند حدوث تسمم بواسطة المعدن الثقيل يمكن استخدام زلال البيض او الحليب كترياق وصناعيا تستخدم بعض المعادن في ترسيب البروتينات كما في حالة دباغة الجلود مثل الكروم وتسمى هذه الحالة بالدباغة المعدنية.

2. الترسيب باستخدام الأحماض العضوية وغير العضوية

أ) استخدام حامض السالسليك: حيث يتكون راسب ابيض ويعتبر هذا كشف عن وجود الألبومين في الإدرار

ب) استخدام كاشف أسباخ (حامض الكبريتيك +حامض الستريك) حيث يتكون راسب اصفر ويستخدم هذا الاختبار لتحديد كمية الألبومين في الإدرار

ت) استخدام حامض البكريك المشبع ($(O_2N)_3C_6H_2OH$)

ث) استخدام تنكستات الصوديوم (Na_2WO_4)

ج) استخدام حامض التانيك ($C_{76}H_{52}O_{46}$)

ح) استخدام حامض الخليك في صناعة الالبان

الترسيب باستخدام الأحماض المعدنية المركزة ،عملية الترسيب تعتمد على الغاء عامل الشحنة اذا يحاط الجزء الموجب من البروتين بالشحنات السالبة للحامض العضوي او اللاعضوي مثل حامض الكبريتيك والهيدروكلوريك **فترسب البروتين ولكن الراسب يذوب بإضافة زيادة من الحامض المركز.** (ويعتبر ترسيب عكسي).

اما الترسيب بحامض النتريك المركز (كشف هيلر) (ترسيب غير عكسي) في الوسط شديد الحموضة تتكون شحنات موجبة على البروتين فتنجذب الجزيئات إلى أنيونات الأحماض وتعمل على ترسيبها.

عند اضافه حامض معدني مركز الى محلول البروتين يؤدي ذلك الى تغير جوهر البروتين الطبيعي فيترسب نتيجة لذلك ولا يمكن اذابته مره ثانيه.

3. الترسيب باستخدام الكحولات: كالميثانول والايثانول اذ ترتبط مجموعة (OH) في الكحول مع مجموعة (H+) للماء (المذيب) وبالتالي تلغى اصرة (بروتين – ماء) وتتولد اصرة (بروتين – بروتين) فيترسب البروتين. نوع من الترسيب غير العكسي لان الكحول قد يؤثر على طبيعة البروتين الحيوية من خلال كسر الاواصر الهيدروجينية والكبريتية المسؤولة عن التركيب الثلاثي للبروتينات.

4. ترسيب باستخدام الاملاح المعدنية: تستخدم لهذا الغرض انواع مختلفة من الاملاح المعدنية الاحادية و الثنائية والثلاثية الشحنات مثل كلوريد الصوديوم NaCl و كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ وغيرها. تتشارك هذه الاملاح بشحنات موجبة وسالبة في محاليل البروتينات مما يؤدي لسحب جزيئات الماء من البروتين فتكسر اصرة (البروتين – مذيب) و تتولد اصرة جديدة هي (بروتين- بروتين) وبالتالي تترسب البروتينات. ان درجة الترسيب الحاصل **يعتمد على تركيز ونوع الملح المتعادل المستعمل، طبيعة البروتين ووزنه الجزيئي.** وتستخدم طريقة التمليح (الخارجي) في فصل البروتينات في مزيج منها وذلك بزياده تركيز الملح بصوره تدريجيه ، من اكثر الاملاح شيوعا في الاستخدام هو كبريتات الامونيوم . (ترسيب عكسي)

" التمليح الداخلي " (تراكيز واطئة من الاملاح المتعادلة)

" التمليح الخارجي " (زيادة تراكيز الاملاح)

٥- التجلط الحراري Clotting or Coagulation:

تتعرض البروتينات لدرجات حرارة عالية تؤدي الى حدوث مسخ (Denaturation) في هيئة البروتين بسبب التأثر الناتج من الحرارة العالية على كسر أواصر البروتين الهيدروجينية وغيرها (ترسيب غير عكسي) .

ويحدث التغير على البنائين الثانوي والثلاثي ولا يتأثر البناء الاولي (السلسلة الببتيدية) اي ان التسخين يكسر الاواصر الثانوية لجزيء البروتين وتتغير الخواص الفيزيائية ومنها زياده اللزوجة وانخفاض قابليه الذوبان.

من الناحية العملية يعد ترسب البروتينات احدى اهم التغيرات الفيزيائية الناتجة عن تغير جوهر البروتين ، ان عمليه التجلط بالحرارة تمر بمرحلتين :-

1- تغير طبيعة البروتين بفعل الحرارة

2- التجبن (فصل البروتين المترسب بصوره مميزه)

يستخدم هذا الكشف لتميز الكلوبيولين والالبومين (لانهما يتخثران بالحرارة) عكس اغلب البروتينات التي لا تتأثر بالحرارة في محيطها الطبيعي

سؤال : ماهو سبب تجبن الحليب في بعض الاحيان عند غليه ؟

من العوامل الأخرى التي توثر على البروتينات تسبب مسخ هي:

1. الرج والتحريك يسبب مسخ للبروتين المنتشر فوق الفقاعات الهوائية
2. التعرض للإشعاعات
3. السحق والطحن (يسبب تحطيم الاصرة الببتيدية)
4. الحوامض والقواعد القوية (بسبب تحطيم الاصرة الملحية)
5. الحرارة (بسبب تحطيم الاصرة الملحية)

اختبار الذوبانية للبروتينات Protein Solubility

ان دراسة ذوبان البروتينات تكتسي أهمية كبيرة في فصل البروتينات واستخلاصها ويعتمد ذوبان البروتينات على عدة عوامل منها:

- نوع السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية
- بنية البروتين الخارجي (كروي أوليفي)
- والبعض الآخر يتعلق بعوامل خارجية مثل القوة الأيونية للمحلول – درجة الـpH - درجة الحرارة – نوع المذيب المستعمل.

هدف الاختبار:

توضيح طبيعة البروتينات من أنها جزيئات عملاقة تحتوي على مجموعات فعالة عليها شحنات كهربائية خاصة في السلاسل الجانبية للأحماض الأمينية مثل $NH3^+$ و$NH2^+$ و NH^+ وCOO^- وS^- وO^- .....الخ. وكذلك أنها مواد امفوتيرية يذوب الكثير من البروتينات في الماء لارتباط جزيئات الماء القطبية بالمجموعات الفعالة في البروتين وتكون محاليل غروية نظراً لكبر حجم جزيئات البروتين وتتأثر درجة الذوبان بقيمة PH المحلول وتبلغ أدناها عند درجة التعادل الكهربائي للبروتين. حيث يزيد التجاذب بين الجزيئات و يسبب تجمعها وترسبها. أما في وسط حامضي بالنسبة لنقطة التعادل الكهربائي فتتناظر الجزيئات نتيجة لوجود شحنة موجبة مما يمنع ترسب الجزيئات وكذلك في الوسط القلوي بالنسبة لنقطة التعادل الكهربائي. حيث تكون الجزيئات سالبة الشحنة الكهربائية.

المواد و الأدوات:

محاليل بروتينات:

1. البيومين Albumin (٢%) و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم %NaCl (١%)
2. محلول جيلاتين Gelatin (١%)
3. محلول كازين Casein (١%)

محلول هيدروكسيد الصوديوم (٠،١%) NaOH
أنابيب إختبار نظيفة

طريقة العمل:

اختبر ذوبان كل من البروتينات (البيومين، جيلاتين، كازين) في كل من الماء البارد و الماء الحار و محلول هيدروكسيد الصوديوم

سجل قابلية ذوبان كل من البروتينات في جدول النتائج.

دون ملاحظاتك وناقش ما لاحظته

البروتين	نوع البروتين	قابلة الذوبان في الماء البارد	قابلة الذوبان في الماء الحار	قابلة الذوبان في 1%NaOH
البيومين	بسيط			
كازين	مرتبط			
جيلاتين	مشتق			